

铃兰族 *rbcL* 基因的 PCR-RFLP 分析*

黄锦岭 邹喻萍 张志宪 洪德元

(中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室, 北京 100093)

PCR-RFLP ANALYSIS OF *rbcL* GENE IN THE TRIBE *CONVALLARIEAE*

Huang Jin-ling Zou Yu-ping Zhang Zhi-xian Hong De-yuan

(Laboratory of Systematic & Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

Abstract The evolutionary history of the tribe Convallarieae (s. l.) is constructed by comparative RFLP of PCR-amplified chloroplast DNA fragment and subsequent phenetic analyses with UPGMA method. The results show that the genus *Tupistra* and the genus *Aspidistra* are phylogenetically closely related, and the genus *Theropogon* may be alien to the other genera of the tribe, supporting the conclusion derived from morphological, karyotypical and palynological aspects. In addition, the systematic position of the genus *Convallaria* is also discussed.

Key words RFLP; Convallarieae; Molecular Systematics

摘要 本文用 7 属 9 种铃兰族 Tribe convallarieae 植物的叶绿体 DNA 中 *rbcL* 基因片段的 PCR 产物的 RFLP 结果进行聚类分析。结果表明:开口箭属与蜘蛛抱蛋属关系密切,夏须草属与族内其余各属亲缘关系稍远,与外部器官形态、核型和孢粉学资料所得出的结论基本一致。此外,本文对铃兰属的系统位置也进行了讨论。

关键词 RFLP; 铃兰族; 分子系统学

铃兰族隶属广义的百合科,辖夏须草 *Theropogon*、铃兰 *Convallaria*、白穗花 *Speirantha*、吉祥草 *Reineckia*、万年青 *Rhodea*、开口箭 *Tupistra* 和蜘蛛抱蛋 *Aspidistra* 7 属(汪发缵等, 1978)。除开口箭和蜘蛛抱蛋 2 属外,其余 5 属皆为单型属。本族植物的研究虽然在形态解剖学、核型和孢粉学等方面都有较为详尽的报道(杨亲二等, 1993; 马黎明等, 1990; 杨涤清等, 1983; Utech, 1979; Kurosawa, 1977; Hong *et al.*, 1976; Utech *et al.*, 1976; Sato, 1942),但对于各属间的系统位置,系统学家争议颇大,至今尚无统一的认识。

现代分子生物学的飞速发展和渗透,为植物系统学这门古老的学科注入了新的活力,特别是对遗传物质 DNA 的比较分析,为揭示植物类群间的演化关系提供了最直接的证据。近年来,叶绿体 DNA 限制性片段长度多态技术(RFLP)在植物系统学领域也有较多的应用(Shinwari *et al.*, 1994; Rieseberg *et al.*, 1992; Jansen *et al.*, 1991)。

* 国家自然科学基金资助课题。

1995-09-08 收稿。

本文采用 DNA 聚合酶链式反应(PCR)和 RFLP 技术,对铃兰族内 7 属 9 种植物限制性内切酶位点作了比较分析,并据此对族内各属系统发育作了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料来源 所有实验材料取自本所温室栽培的活体植株。来源见附录。

1.2 试剂和仪器 (a) Taq DNA 聚合酶为北京农业大学产品。(b)限制性内切酶和 dNTP 为 Promega 公司产品。(c)PCR 反应在 Pharmacia Gene ATAQ Controller 上进行。(d)PCR 反应引物根据烟草 cpDNA 全序列(Shinozaki *et al.*, 1986)设计。

1.3 总 DNA 的提取 总 DNA 的提取参照 Guillemat & Marechal-Drouard (1992)的方法。

1.4 PCR 反应 每 100 μ l PCR 反应体积中包括:50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3);250 μ g BSA; 2 mmol/L $MgCl_2$; dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 各 200 μ mol/L;2.5 单位 Taq DNA 聚合酶;总 DNA 20 ng;引物各 50 pmol;引物 1 在烟草基因组 57586~57615 bps 位置,其碱基序列为 5'-ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGT-3'。引物 2 在 cpDNA 基因组 60860~60839 bp 位置,其碱基序列为 5'-ACTACAGATCT-CATACTACCCC-3'。由中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室在 Chruachem PS-250 合成仪上合成。

在烟草中,这对引物之间 DNA 片段长度为 3274 bp,包括 *rbcL* 基因 1575 bp(占 *rbcL* 基因全长 1755 bp 的 89%)一段非编码区和 ORF512 的一部分。

PCR 反应时间依次为 70 $^{\circ}C$ 热启动 4 min, 94 $^{\circ}C$ 变性 2 min,接以 94 $^{\circ}C$ 30 s、50 $^{\circ}C$ 30 s、70 $^{\circ}C$ 3 min 计 30 个循环。末次循环 72 $^{\circ}C$ 延伸 5 min。PCR 产物用氯仿:异戊醇(24:1)提纯后,电泳检查其分子量。

1.5 限制性内切酶消化 实验选用 Alu I、Dde I、BamH I、Bcl I、Cla I、EcoR I、EcoR V、Hae III、Hind III、Hinf I、Kpn I、Mbo I、Msp I、Pst I、Rsa I、Sac I、Sal I、Sty I、Taq I、Xba I、Xho I 共 21 种限制性内切酶进行酶解。当 *rbcL* 基因或 ORF 及非编码区的有些酶切位点难以确定时,采用了 Msp I + Bcl I; Hae III + kpn I; Taq I + Sac I; Hinf I + Kpn I 等组合的双酶切。酶解溶液体积为 20 μ l,内含 10 μ l 纯化后的 PCR 产物,10 单位限制性内切酶和 2 μ l 相应的限制性内切酶缓冲液。在适当温度下(依不同的酶而定)消化 2~3 h。

1.6 琼脂糖凝胶电泳 配制 1.5% 的琼脂糖平板凝胶,在 1 $\times$ TBE 缓冲液中电泳,电压 2~5 v/cm,紫外灯下观察、照像(见图版 1)。

1.7 数据分析 根据 PCR 产物中某一位置切点的有无,以 1、0 表示,用 UPGMA 法进行聚类分析,选用徐克学先生(1994)软件程序在计算机上进行运算,构建族内各属系统发育关系图。

2 实验结果

经电泳检验,铃兰族各属 *rbcL*/ORF 基因片段 PCR 扩增产物约为 3180 bp,与 Arnold (1991)估计结果相似。其中包括 *rbcL* 基因 1413 bp(Shinwari *et al.*, 1994),其余片段为

ORF 和基因间的非编码区(intergene, noncoding sequence)。各属之间未发现明显的长度变异。限制性位点的确定参照铃兰 *Convallaria majalis* *rbcl* 基因序列(Shinwari *et al.*, 1994), 在计算机上模拟酶切, 同时结合部分双酶切进行。个别位点难以确定时, 标出最可能的位点。计确定 76 个酶切位点, 包括 19 个突变位点(表 1), 其中 10 个分布在 *rbcl* 基因上, 9 个分布在 ORF 及非编码区的扩增产物上。同时, 根据突变位点的有无, 建立聚类分析矩阵(表 2)。

表 1 铃兰族 *rbcl*/ORF 片段限制性位点分析

Table 1 The distribution of Restriction site of *rbcl*/ORF fragment in the Tribe Convallarieae

编号 No.	性状 Character	酶 Enzyme	位置* Position	分布** Distribution
1		Alu I	44	
2		EcoR V	106	
3		Msp I	138	
4		Alu I	173	
5		Hinf I	179	
6		Rsa I	193	
7		Mbo I	232	
8	1	Hae III	266	-Con
9		Alu I	305	
10		Sty I	360	
11		Alu I	395	
12		Sac I	397	
13		Mbo I	409	
14		EcoR I	417	
15		Sty I	445	
16		Hae III	450	
17	2	Taq I	475	+The
18		Rsa I	517	
19		Sty I	600	
20		Rsa I	736	
21	3	Mbo I	760	+The
22	4	Pst I	780	+Spe
23	5	Alu I	785	-Spe, -Rei, -The
24	6	Sac I	787	-Spe, -Rei, -The
25		Hinf I	819	
26	7	Bcl I	860	+The
27		Rsa I	939	
28		Alu I	944	
29		Mbo I	770	
30		Rsa I	988	
31	8	Msp I	1140	+Rei, +Rho
32		Hinf I	1190	
33	9	Rsa I	1197	-Alo
34		Sty I	1229	
35		Alu I	1256	
36		Rsa I	1284	
37		Alu I	1289	

cont.				
38	10	Hae III	1300	+The
39		Mbo I	1306	
40		Hind III	1341	
41		Alu I	1343	
42		Hinf I	1350	
43		Alu I	1367	
44		Mbo I	1390	
45		EcoR I	1403	
46	11	Hae III	+1420	Tup, + Asi, + Alo, + Asa
47		Taq I	1500	
48		Mbo I	1530	
49		Hae III	1600	
50		BamH I	1605	
51		Sty I	1609	
52	12	Dde I	1700	+Con
53	13	Taq I	1720	+Con
54		Msp I	1738	
55		Mbo I	1900	
56		Taq I	1920	
57	14	Msp I	1938	+Alo
58	15	Xba I	2000	-Con
59		Hinf I	2085	
60		Rsa I	2090	
61		Hae III	2120	
62		Taq I	2180	
63		Msp I	2188	
64		EcoR V	2250	
65		Dde I	2260	
66		Taq I	2300	
67	16	Taq I	2400	+The
68		Dde I	2540	
69		Rsa I	2554	
70		Kpn I	2570	
71	17	Mbo I	2650	-Tup
72		Hinf I	2890	
73	18	Msp I	2890	-Asi, -Alo, -Asa
74	19	Rsa I	3014	+Con
75		Mbo I	3050	
76		Hinf I	3090	

* 在 rbcL/ORF 片段上的近似位置。* * + 表示位点存在；- 表示位点缺失。

* The position closed with rbcL/ORF fragment. * * + means site present; - means site absent.

Con=*Convallaria majalis*, Spe=*Speirantha gardenii*, Rei=*Reineckia carnea*, Rho=*Rhodea japonica*, The=*Theropogon pallidus*, Tup=*Tupistra longispica*, Asi=*Aspidistra sichuanensis*, Alo=*A. longiloba*, Asa=*A. saricola*.

根据 UPGMA 法, 选用距离系数和 $\frac{A+B-2C}{n}$ 两个系数进行聚类分析的结果总体相似(图 1)。

表 2 铃兰族 *rbcl*/ORF 片段限制性位点分析矩阵
Table 2 The analytical matrix of Restriction sites in the Tribe Convallarieae

种名 Species	性状 Character																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<i>Gonvallaria majalis</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
<i>Speirantha gardenii</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
<i>Reineckia carnea</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
<i>Rhodea japonica</i>	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
<i>Theropogon pallidus</i>	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0
<i>Tupistra longispica</i>	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
<i>Aspidistra sichuanensis</i>	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>A. longiloba</i>	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
<i>A. saxicola</i>	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0

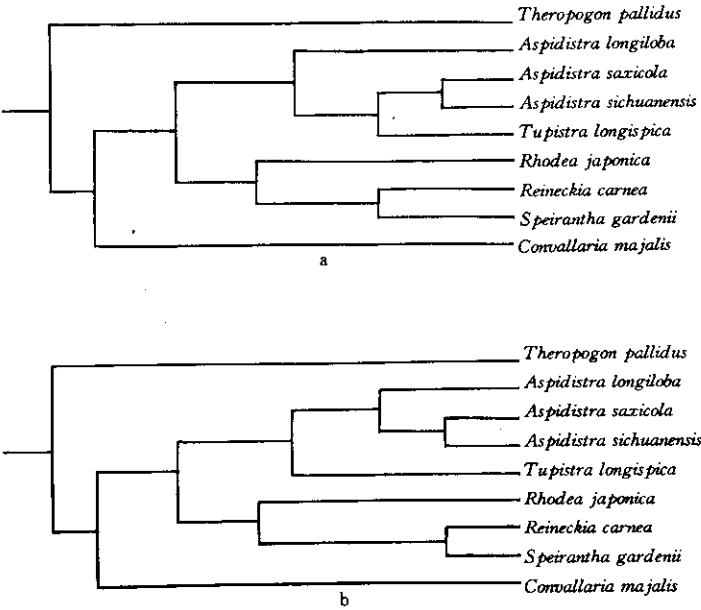


图 1 用 UPGMA 法构建的分子系统树 a. $(a+b-2c)/n$ b. 距离系数
Fig. 1 The phenetic analysis based on UPGMA a. $(a+b-2c)/n$ b. distance coefficient

3 讨 论

3.1 开口箭属与蜘蛛抱蛋属的关系 开口箭属和蜘蛛抱蛋属的系统关系争论已久。一种观点认为二者亲缘关系较远,应置于不同的科或族中(马黎明等,1990;Hong *et al.*, 1989. Nakai, 1974;Chang *et al.*, 1936;)。另一种观点认为二者关系密切,蜘蛛抱蛋属由开口箭属演化而来(黄锦岭等,1990,1989)。本次实验选用的长穗开口箭 *T. longispica*、石山蜘蛛抱蛋 *A. saxicola*、四川蜘蛛抱蛋 *A. sichuanensis* 和巨型蜘蛛抱蛋 *A. longiloba* 共 2 属 4 种植物,除前者具穗状花序、后者花序具单花外,花部式样、核型结构和花粉形态都基本一致。在两个聚类分析的系统图上,虽然长穗开口箭和巨型蜘蛛抱蛋的位置稍有变动,但都处在相邻位置,这说明开口箭属具二型性核型的种类和蜘蛛抱蛋属有十分密切的关系。

3.2 开口箭属与万年青属的关系 开口箭属按照黄锦岭和李恒(1990)的观点,划分为两

个亚属。在开口箭亚属 Subgenus *Tupistra* 中有一群植物如 *T. fungilliformis*、*T. grandistigma*、*T. longispica* 和 *T. pingbianensis* 等柱头显著膨大, 盾状或蘑菇状。核型为二型性。花粉粒球形, 无萌发孔, 外壁具皱波状、疣状或芽泡状纹饰(黄锦岭和洪德元, 另文发表), 亲缘关系与蜘蛛抱蛋属接近。在短柱亚属 Subgenus *Campylandra* 中, 柱头则相对较小, 花丝分离部分较长。单型性核型。花粉粒一般为椭圆形, 具远极单槽, 网状或穿孔状纹饰。一般认为, 短柱亚属中的开口箭种类在核型结构、花部式样和花粉形态都与万年青属接近。

在系统图上, 万年青属与白穗花属和吉祥草属亲缘关系接近, 而与长穗开口箭亲缘关系则稍远。需指出的是, 长穗开口箭在开口箭属中隶开口箭亚属, 而处在短柱亚属的开口箭种类, 由于材料来源的缺乏, 未能在系统图上得到反映, 以至于我们不能更深一步地探讨开口箭属与万年青属以及开口箭属内亚属间的关系, 这是本项工作的缺陷之一, 也是以后我们所要研究的任务。

3.3 夏须草属的系统位置 夏须草属在系统图上最后与铃兰族内其它各属聚类在一起, 表明了其与族内其它各属亲缘较远。

铃兰族各属染色体基数都有 $x=19$; (Hong *et al.*, 1987; 杨涤清等, 1983; Sato, 1942), 仅夏须草属基数为 $x=20$ (杨亲二等, 1993; Kurosawa, 1977), 且其花部维管束系统(Utech, 1979)和花粉形态(马黎明等, 1990; 汤彦承等, 1985)与其它各属都有显著差异, 因此常被认为是族内的一个异质类群。分子系统学资料与该属形态解剖、核型结构和孢粉学等方面的研究结果基本一致。

3.4 铃兰属的系统位置

聚类分析的结果表明铃兰属与开口箭、万年青、蜘蛛抱蛋、吉祥草和白穗花等属分化较早, 与传统结论稍有不同。

铃兰属植物具总状花序, 染色体基数 $x=19$, 单型性核型, 花粉粒椭圆形, 单槽, 外壁具网状纹饰。因此, 一般认为铃兰属与吉祥草属和白穗花属亲缘关系接近, 共同组成铃兰亚族或狭义的铃兰族, 这也是目前多数学者的观点。但是, 上述特征多属于铃兰亚族或狭义铃兰族的共同属性。根据 Cheadle *et al.* (1971) 和刘明英(1992)对广义百合科中根、茎管状分子的比较研究结果, 铃兰属的 *C. majalis* 根部导管外形短粗, 穿孔板具单穿孔, 而铃兰族内含吉祥草、万年青和蜘蛛抱蛋等属根部导管则细长, 穿孔板则具多数横隔。马黎明和洪德元(1990)对铃兰属叶表皮特征的研究结果也表明铃兰属在表皮细胞形状、角质层加厚方式上与族内其余各属有较大差异。从分布区上看, 铃兰属植物广布于北半球温带, 而族内其余各属则都集中分布于东亚, 特别是中国和日本的亚热带和热带地区, 与前者明显不同。虽然我们不能单纯根据地理分布来推断各属间亲缘关系, 但是联系到铃兰属在解剖学和叶绿体 DNA RFLP 方面与族内各属的差异, 我们不能不考虑到铃兰属与吉祥草属、白穗花属的亲缘关系也许并非象通常所认为的那样密切, 这在铃兰亚族内铃兰、夏须草、吉祥草和白穗花四属皆为单型属或寡型属、性状较为孤立等方面也得到反映。

参 考 文 献

- 马黎明, 洪德元. 1990. 铃兰族(广义)花粉形态与叶表皮特征的研究. 植物分类学报, 28(3): 228~236
刘明英. 1992. 百合科植物比较形态解剖学研究 I. 万年青、吉祥草、紫花玉簪、芦荟、吊兰后生木质部管状分子的比较解剖. 四川大学学报(自然科学版), 29(1): 149~154
汤彦承, 张无休. 1985. 铃兰族的花粉研究及夏须草属的系统位置的探讨. 植物分类学报, 23(2): 91~96

- 汪发纛,唐进. 1978. 中国植物志,第 15 卷. 北京:科学出版社. 1~24
- 杨亲二,洪德元. 1993. 夏须草属的核型研究. 云南植物研究, **15** (3): 263~268
- 杨涤清,朱燮稔. 1983. 白穗花的染色体核型分析. 植物分类学报, **21** (1): 50~59
- 黄锦岭,李恒. 1990. 开口箭属的分类系统. 云南植物研究, 增刊 **1**: 49~61
- 黄锦岭,李恒,顾志建,刘宪章. 1989. 百合科开口箭属六个种的核型研究. 云南植物研究, **11** (3): 343~349
- Arnold M L, Buckner C M, Robinson J J. 1991. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. Proc Natl Acad Sci USA, **88**: 1398~1402
- Chang H J, Hsu C C. 1974. A cytotaxonomical study on some Formosan Liliaceae. Taiwan. **19** (1): 58~74
- Cheadle V, Kosakai H. 1971. Vessels in Liliaceae. Phytomorphology, **21** (4): 320~333
- Guillemart P, Marechal-Drouard L. 1992. Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive, and reliable method. Pl Mol Biol Rep, **10** (1): 60~65
- Hong D Y, Ma L M, Chen T 1989. A discussion on the karyotype and evolution of the tribe Convallarieae (s. l.) (Liliaceae). In: Hong ed. Plant Chromosome Research. Nishiki Print Co., Hiroshima. 123~129.
- Jansen R K, Michaels H J, Palmer J D. 1991. Phylogeny and character evolution in the Asteraceae based on chloroplast DNA restriction site mapping. Syst Bot, **16**: 98~115
- Kurosawa S. 1977. Notes on chromosome number of spermatophytes (1). J Jap Bot, **52** (8): 225~230
- Nakai T. 1936. Subdivision of Convallarieae Link. J Jap Bot, **12**: 145~150
- Rieseberg L H, Hanson M A, Philbrick C T. 1992. Androdioecy is derived from dioecy in Datisceae: evidence from restriction site mapping of PCT-amplified chloroplast DNA fragments. Syst Bot, **17** (2): 324~336
- Sato D. 1942. Karyotype alteration and phylogeny in Liliaceae and allied families. Jap J Bot, **12**: 57~161
- Shinwari Z K, Kato H, Terauchi R. *et al.*. 1994. Phylogenetic relationship among genera in the liliaceae-Asparagoideae-Polygonatae s. l. inferred from rbcL gene sequence data. Pl Syst Evol, **192**: 263~277
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M *et al.*. 1986. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. EMBO J, **5** (9): 2043~2049
- Utech F H. 1979. Floral vascular anatomy of the Himalayan Theropogon pallidus Maxim. (Liliaceae-Convallarieae). Ann Carnegie Mus, **48** (3): 25~41
- Utech F H, Kawano S. 1976. Floral vascular anatomy of Convallaria majalis L. and C. Keiskei Miq. (Liliaceae-Convallarieae). Bot Mag Tokyo, **89**: 173~182.

图版说明 Explanation of plate

图版1 铃兰族 rbcL/DRF 片段的 PCR 产物酶切

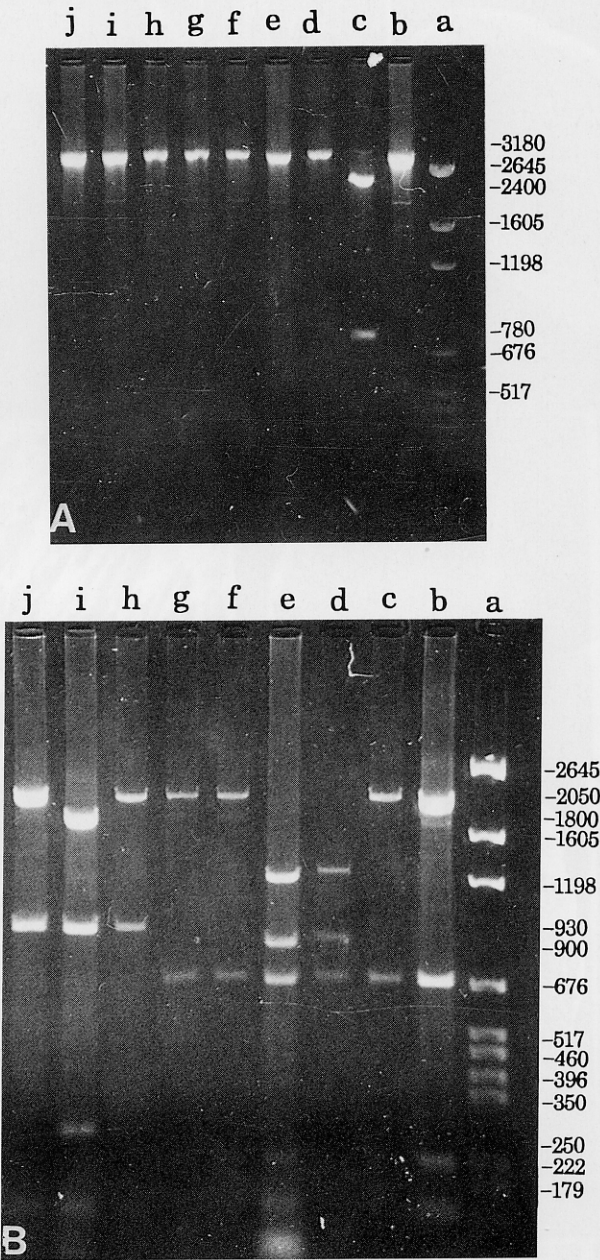
Plate 1. Restriction endonuclease digestion of amplified rbcL/ORF fragments in Tribe Convallarieae

A. Pst I digest. (a) pGEM DNA Marker; (b) *Convallaria majalis*; (c) *Speirantha gardenii*; (d) *Reineckia carnea*; (e) *Rhodea japonica*; (f) *Theropogon pallidus*; (g) *Tupistra longispica*; (h) *Aspidistra sichuanensis*; I. *A. longiloba*; (j) *A. saxicola*.

B. MspI digest. (a) pGEM DNA Marker; (b) *Convallaria majalis*; (c) *Speirantha gardenii*; (d) *Reineckia carnea*; (e) *Rhodea japonica*; (f) *Theropogon pallidus*; (g) *Tupistra longispica*; (h) *Aspidistra sichuanensis*; I. *A. longiloba*; (j). *A. saxicola*.

附录:材料来源 Appendix:Origin of materials

夏须草 *Theropogon pallidus* Maxim., 云南永德大雪山, 杨亲二 91001. 铃兰 *Convallaria majalis* L., 北京植物园栽培. PB94001. 吉祥草 *Reineckia carnea* Kunth, 四川马边大竹堡乡, PB84045. 万年青 *Rhodea japonica* Roth, 四川 L. Ap-19. 白穗花 *Speirantha gardenii* (Hook.) Baill. 安徽黄山, PB94002. 长穗开口箭 *Tupistra longispica* Y. Wan, 广西南宁, PB85123. 石山蜘蛛抱蛋 *Aspidistra saxicola* Y. Wan, 广西南宁, PB86116. 四川蜘蛛抱蛋 *Aspidistra sichuanensis* K. Y. Lang et Z. Y. Zhu, 四川马边大竹堡乡, PB84041. 巨型蜘蛛抱蛋 *Aspidistra longiloba* G. Z. Li, 广西天峨, PB89036.



See explanation at the end of text